



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

ATTY.'S DOCKET: NOZAKI=8.1A

In re Application of:	)	Confirmation No. 3949
	)	
Masako NOZAKI	)	Art Unit: 1614
	)	
Appln. No.: 10/721,742	)	Examiner:
	)	
Filed: November 26, 2003	)	Washington, D.C.
	)	
For: METHOD OF TREATING OR	)	April 2, 2004
INHIBITING THE DEVELOPMENT)	)	
OF BRAIN INFLAMMATION AND )	)	
SEPSIS	)	

REQUEST FOR PRIORITY

U.S. Patent and Trademark Office  
2011 South Clark Place  
Customer Window  
Crystal Plaza Two, Lobby, Room 1b03  
Arlington, Virginia 22202

Sir:

In accordance with the provisions of 37 CFR §1.55 and the requirements of 35 U.S.C. §119, filed herewith a certified copy of:

Japanese Appln. No.: 2003-142759	Filed: May 5, 2003
----------------------------------	--------------------

It is respectfully requested that applicant be granted the benefit of the priority date of the foreign application.

Respectfully submitted,

BROWDY AND NEIMARK, P.L.L.C.  
Attorneys for Applicant(s)

By

Allen C. Yun  
Registration No. 37,971

ACY:pp  
Telephone No.: (202) 628-5197  
Facsimile No.: (202) 737-3528  
G:/bn//pto/PriorityDocPTOCoverLtr8march04.doc



日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 3 年    5 月 2 0 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 3 - 1 4 2 7 5 9  
Application Number:  
[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 3 - 1 4 2 7 5 9 ]

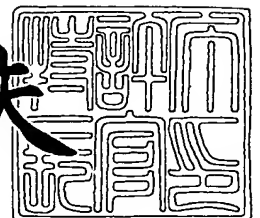
出      願      人                      野 崎    昌 子  
Applicant(s):



2 0 0 4 年    2 月 1 8 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号    出証特 2 0 0 4 - 3 0 1 0 2 9 1

【書類名】 特許願

【整理番号】 2003P1670

【提出日】 平成15年 5月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 31/41  
C07D405/04  
G01N 33/15

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市南区北ノ沢 4 - 1 - 4 0

【氏名】 野崎 昌子

【特許出願人】

【住所又は居所】 北海道札幌市南区北ノ沢 4 - 1 - 4 0

【氏名又は名称】 野崎 昌子

【代理人】

【識別番号】 100107984

【弁理士】

【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【選任した代理人】

【識別番号】 100102255

【弁理士】

【氏名又は名称】 小澤 誠次

【選任した代理人】

【識別番号】 100118957

【弁理士】

【氏名又は名称】 岡 晴子

【選任した代理人】

【識別番号】 100123168

【弁理士】

【氏名又は名称】 大▲高▼ とし子

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100120086

【弁理士】

【氏名又は名称】 ▲高▼津 一也

## 【パリ条約による優先権等の主張】

【国名】 アメリカ合衆国

【出願日】 2002年11月29日

【出願番号】 60/429, 558

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044347

【納付金額】 21, 000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 血管透過性亢進抑制剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 血液脳関門を通過せず若しくは殆ど通過することなく、毛細血管の血管内皮細胞に作用し、毛細血管内の血漿成分、血球等の組織への漏出を防ぐことができる哺乳動物における血管透過性亢進抑制剤。

【請求項 2】 哺乳動物がヒトである請求項 1 記載の血管透過性亢進抑制剤。

【請求項 3】 ロイコトリエン  $C_4$  及び  $D_4$  受容体拮抗剤又はその薬理学的に許容される塩を有効成分とする請求項 1 又は 2 記載の血管透過性亢進抑制剤。

【請求項 4】 ロイコトリエン  $C_4$  及び  $D_4$  受容体拮抗剤がプラシルカストである請求項 3 記載の血管透過性亢進抑制剤。

【請求項 5】 非ヒト哺乳動物の脳の硬膜を貫通させクモ膜下腔に挿入したカニューレを介して、炎症誘発剤をクモ膜下腔に導入する前後に、被検物質を前記非ヒト哺乳動物に投与し、前記カニューレを介して回収した脳脊髄液量を測定することを特徴とする血管透過性亢進抑制剤のスクリーニング方法。

【請求項 6】 非ヒト哺乳動物がラット、犬、猫又はウサギである請求項 5 記載の血管透過性亢進抑制剤のスクリーニング方法。

【請求項 7】 炎症誘発剤がアラキドン酸、プロスタグランジン、トロンボキサン、ヒスタミン、イースト、LPS、デキストラン、ブラジキニン、カラゲニン、ロイコトリエン、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$  又は  $IL-6$  である請求項 5 又は 6 記載の血管透過性亢進抑制剤のスクリーニング方法。

【請求項 8】 被検物質が抗炎症剤から選ばれる請求項 5 ～ 7 のいずれか記載の血管透過性亢進抑制剤のスクリーニング方法。

【請求項 9】 被検物質を経口、皮下、腹腔内又は静脈内投与する請求項 5 ～ 8 のいずれか記載の血管透過性亢進抑制剤のスクリーニング方法。

【請求項 10】 脳脊髄液量とともに、脳脊髄液中の白血球細胞数を測定する請求項 5 ～ 9 のいずれか記載の血管透過性亢進抑制剤のスクリーニング方法。

【請求項 11】 経時的に脳脊髄液を回収する請求項 5 ～ 10 のいずれか記

載の血管透過性亢進抑制剤のスクリーニング方法。

【請求項 1 2】 請求項 1 ～ 4 のいずれか記載の血管透過性亢進抑制剤を有効成分とする脳の炎症の発生予防又は症状改善剤。

【請求項 1 3】 脳の炎症が脳浮腫である請求項 1 2 記載の脳の炎症の発生予防又は症状改善剤。

【請求項 1 4】 脳の炎症が脳梗塞である請求項 1 2 記載の脳の炎症の発生予防又は症状改善剤。

【請求項 1 5】 脳の炎症が感染症に起因する炎症である請求項 1 2 記載の脳の炎症の発生予防又は症状改善剤。

【請求項 1 6】 脳の炎症が脳外傷に起因する炎症である請求項 1 2 記載の脳の炎症の発生予防又は症状改善剤。

【請求項 1 7】 脳外傷が外科手術によるものである請求項 1 6 記載の脳の炎症の発生予防又は症状改善剤。

【請求項 1 8】 脳手術に先立って投与されることを特徴とする請求項 1 2 記載の脳の炎症の発生予防又は症状改善剤。

【請求項 1 9】 請求項 1 ～ 4 のいずれか記載の血管透過性亢進抑制剤を有効成分とする敗血症の予防及び／又は症状改善剤。

【請求項 2 0】 敗血症が重症急性呼吸器症候群（S A R S）である請求項 1 9 記載の敗血症の予防及び／又は症状改善剤。

【請求項 2 1】 請求項 1 ～ 4 のいずれか記載の血管透過性亢進抑制剤を、必要とする哺乳動物に治療有効量投与することからなる哺乳動物における脳の炎症の発生又はその症状を治療又は抑制する方法。

【請求項 2 2】 脳の炎症が脳浮腫である請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 3】 脳の炎症が脳梗塞である請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 4】 脳の炎症が感染症に起因する炎症である請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 5】 脳の炎症が脳外傷に起因する請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 6】 脳外傷が外科手術によるものである請求項 2 5 記載の方法。

。

【請求項 2 7】 脳手術に先立って投与されることを特徴とする請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 8】 ロイコトリエン C<sub>4</sub>及び D<sub>4</sub>受容体拮抗剤の治療有効量が、 5 m g ～ 9 0 0 m g であることを特徴とする請求項 2 1 ～ 2 7 のいずれか記載の方法。

【請求項 2 9】 脳脊髄液における白血球細胞数が正常値に達するまで継続することを特徴とする請求項 2 1 ～ 2 8 のいずれか記載の方法。

【請求項 3 0】 治療有効量のロイコトリエン C<sub>4</sub>及び D<sub>4</sub>受容体拮抗剤又はその薬理学的に許容される塩を患者に投与することからなる侵襲脳手術の前に患者に対して行う前処置方法。

【請求項 3 1】 請求項 1 ～ 4 のいずれか記載の血管透過性亢進抑制剤を、必要とする哺乳動物に治療有効量投与することからなる哺乳動物における敗血症の発症又はその症状を治療又は抑制する方法。

【請求項 3 2】 敗血症が重症急性呼吸器症候群（S A R S）である請求項 3 1 記載の方法。

【請求項 3 3】 ロイコトリエン C<sub>4</sub>及び D<sub>4</sub>受容体拮抗剤の治療有効量が、 5 m g ～ 9 0 0 m g であることを特徴とする請求項 3 1 又は 3 2 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、血管透過性亢進抑制剤やそのスクリーニング方法、前記血管透過性亢進抑制剤を有効成分とする脳の炎症や敗血症の発生予防又は症状改善剤、前記血管透過性亢進抑制剤を投与する脳の炎症や敗血症の発生又はその症状を治療又は抑制する方法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

アラキドン酸（A A）は、物理的要因、温度要因、化学的要因、細菌等、数多くの侵害要因に応答して細胞膜のリン脂質から細胞質中に放出され、その産物（エイコサノイド合成物のプロスタグランジン及びロイコトリエン）は、生物学的

に多方面において重要であることが解明されている。殆どのエイコサノイド化合物には、炎症、疼痛及び熱に対する応答を悪化させる傾向がみられ、抗炎症剤及び鎮痛剤に関する広範な研究の標的となってきた。例えば、コルチゾン等の抗炎症ステロイドは、膜リン脂質からアラキドン酸を生成するホスホリパーゼ酵素類を抑制することにより作用する。アスピリンやイブプロフェン等の鎮痛剤は、アラキドン酸がエイコサノイド、プロスタグランジン、プロスタサイクリン及びトロンボキサンに転換することを制御するサイクロオキシゲナーゼ酵素類をある程度阻止することにより作用する。

#### 【0003】

また、プロスタグランジン及びロイコトリエンは、末梢及び中枢神経系（CNS）の両方において炎症発生に関与していることが知られている。過去30年以上にわたる研究の成果も空しく、プロスタグランジンがどのようにして炎症に関与しているかについては未だ正確に解明されていない。他方、ロイコトリエン受容体拮抗剤を用いた近年の研究により、ロイコトリエンが、上記の過程において大きな役割を果たしている可能性が示唆されている。

#### 【0004】

ロイコトリエンは潜在的脂質メディエーターであり、システイン基の有無に基づき、二分類される。ロイコトリエンB<sub>4</sub>にはシステイン基がないが、ロイコトリエンC<sub>4</sub>、D<sub>4</sub>、E<sub>4</sub>及びF<sub>4</sub>は、システニル-ロイコトリエンである。これらの化合物は、1980年代初頭より炎症剤として認められてきた（非特許文献1～2参照）。

#### 【0005】

1990年代に入ると、体内でロイコトリエン活性を抑制・阻害でき、「ロイコトリエン拮抗剤」として知られる種々の薬剤が同定されるようになった。本発明において「ロイコトリエン拮抗剤」なる用語は、自然のロイコトリエンの1若しくは2以上の亜種が有する濃度、活性又は影響を抑制・阻止し、或いは低減し又は対抗する薬剤について言及するにあたり、従来かかる用語がもつ医学上の意味で用いられている。これらのロイコトリエン拮抗剤は通常、ロイコトリエンの作用に受容体レベルで拮抗する。



## 【 0 0 0 6 】

ロイコトリエン受容体拮抗剤の中には、脳の炎症治療への使用が開示されているものもあるが（例えば、特許文献 1 ～ 4 参照）、これまでの常識では、脳の炎症を低減させたり抑制したり、或いは脳の炎症に由来する脳疾患を治療するには、分子が血液脳関門（B B B）を通過できなければならないとされてきたことから、上記特許文献 1 ～ 4 に記載されているロイコトリエン受容体拮抗剤は、いずれも血液脳関門を通過するものであると考えられる。ところで、ロイコトリエン C<sub>4</sub>及び D<sub>4</sub>受容体拮抗剤は、血液脳関門を通過しないので、脳の炎症の治療若しくは予防にロイコトリエン C<sub>4</sub>及び D<sub>4</sub>受容体拮抗剤が使用されたことは、知り得る範囲において今までなかった。しかしながらロイコトリエン C<sub>4</sub>及び D<sub>4</sub>受容体拮抗剤は、喘息治療には一般に使われてきた。ロイコトリエン C<sub>4</sub>及び D<sub>4</sub>受容体拮抗剤であるプラニルカストは、抗喘息薬として臨床使用されており、副作用が殆ど無いことで知られている。プラニルカストは、ザフィルルカストやモンテルカスト等の他の拮抗剤同様に、血液脳関門を通過しない若しくは通過してもその量は極めて微量である。かかる化合物の上記以外の承認適応症外使用としては、アレルギー性疾患の治療（特許文献 5 参照）、並びに偏頭痛及び群発頭痛の治療（特許文献 6 参照）への適用が示唆されている。

## 【 0 0 0 7 】

一般的に毛細血管は、細胞内間隙、小孔及びピノサイトーシス小胞等の種々の開口部を有する内皮細胞で覆われている。このような毛細血管とは異なり、脳毛細血管においては、内皮細胞間に上記開口部が比較的少なく、末梢由来のタイトジャンクションがみられることが特徴となっている。さらに、中枢神経系の毛細血管は、内皮細胞（末梢由来）の緊密な接合部の上に配置されたアストロサイトグリア細胞に取り囲まれている。血液脳関門は、タイトジャンクションとアストロサイトグリア細胞が連続して層をなす。Neuwelt, E. A. が「脳関門崩壊は治療上有効か」として発表しているように（非特許文献 3 参照）、内皮細胞は、経内皮移動を抑制し、血液内分子が脳に進入することを分子量や脂溶性に基づいて阻止している。例えば、血液脳関門は通常、分子量が 1 8 0 ダルトンを超える分子を排除する。さらに、分子の脂溶性は、血液脳関門通過における主要な制御因子

である。

#### 【0008】

血液脳関門の機能は、神経環境の恒常性維持にある。生理的 pH 条件下において高い脂溶性を有し、低イオン化を示す小分子（分子量が200ダルトン未満）は、自由に血液脳関門を通過する。さらに、細胞外脳脊髄液中の溶解物の浸透圧濃度を均等に維持するために、水分は血液脳関門を双方向に移動できる。

#### 【0009】

血液脳関門固有の生物学的側面として、中枢神経系関連疾患の治療において大きな注目を集めていることが挙げられる。通常血液脳関門においては、脳への潜在有害物質の進入を阻止するような形で内皮細胞同士が接合しているが、炎症時には、この状況が変化する。すなわち、BBBの透過性亢進が起こる。脳梗塞や物理的脳外傷などによる脳の炎症は、人間にとって極めて悲惨な状況を生み出す深刻な医療問題である。

#### 【0010】

脳の炎症治療に挑むために、これまで以下のアプローチが試行されてきた。

（1）浸透療法、すなわち、マンニトール、グリセロール、尿素等の物質を用いて脳組織から水分を浸透除去することにより、頭蓋内圧を低下させる方法。欠点としては、電解質障害や腎不全等の副作用などがある。（2）デキサメタゾン等の化合物を用い、局所的毛細血管漏出を減少させ、また全身の代謝低下を防ぐステロイド療法。欠点は、胃腸出血、電解質障害、高血糖症、免疫能力の低下、代謝要求量の増大、精神障害など多岐にわたる。（3）局所的毛細血管漏出を減少させるインドメタシン、プロベネシド、イブプロフェン等の非ステロイド系抗炎症剤を使用する方法。欠点は、薬理学的効果が不確かなことである。（4）ニトロプルシド等を用いて濾過圧力を低下させることにより、毛細血管漏出を減少させる抗高血圧剤を使用する方法。欠点は、脳灌流圧の低下である。しかしながら、上記いずれの治療によっても脳の炎症は改善をみない。

#### 【0011】

脳の炎症治療に携わる臨床家が直面する難題に加え、脳の炎症は単一の症候を呈しない。脳における炎症反応は、3つの異なる段階を追って進行し、それぞれ

の段階は明らかに異なる機構によって生じる。先ず、局所的な血管拡張及び毛細血管透過性の亢進に特徴付けられる急性一過性段階が現れる。その次に、遅発性に生じる亜急性段階に移行するが、この段階は白血球及び食細胞の遊走が最大の特徴である。最後に、慢性増殖段階へと移行し、脳細胞の壊死、その後グリア細胞が出現するが本来の機能を失う。

#### 【 0 0 1 2 】

脳の炎症は、組織化学法及び電子顕微鏡観察等の種々の方法により評価できる。しかし、炎症の定量化に最も有用なパラメーターは、恐らく脳浮腫の発生であると考えられる。そこで、障害を受けた組織に発生する浮腫の容量を測定することが、新たなアプローチとして登場した。浮腫は、炎症に伴う水分の流入により生じ、臨床的には腫脹として観察される。浮腫は、乾燥前後の組織を比較することにより定量できる。乾燥後の乾燥重量から、蒸発した液体量が算出できる。蒸発した液量は、すなわち形成された浮腫の容量である。

#### 【 0 0 1 3 】

一般に採用される実験方法としては、他にEvansブルーアルブミン等の水溶性染色剤の流入を測定する方法がある。この方法を蛍光法と併用することにより、浮腫の分布を測定することができる。より高度で費用もかかる方法としては、PET（陽電子放射断層法）、CT、MRI（磁気共鳴画像法）等が挙げられるが、radioscintigraphyも使用されてきた。

#### 【 0 0 1 4 】

しかし上記の方法は、血液脳関門の透過性が亢進する結果、形成される浮腫についてのみ評価する方法であり、中枢神経系に遊走する白血球や食細胞を評価することはできない。結局、浮腫は頭蓋内圧亢進を伴い、脳組織に損傷を与え、脳の炎症病理に深刻な影響を及ぼす。また、血管透過性が亢進すると脳浮腫が生じ、次いで白血球細胞（WBC）の遊走が誘発され、コラゲナーゼやエステラーゼといったリソソーム酵素が脳組織を直接損傷することになり、病理症状が一層深刻化する。従って、脳脊髄液（CSF）中のWBC数を知ることにより血液脳関門透過性の変化測定を可能にする。

#### 【 0 0 1 5 】

上述したように、薬剤が脳において効果を発揮するためには、血液脳関門を通過することが必須であると長く信じられてきた。従来の標的戦略では、その代謝物が関門を通過できるプロドラッグを投与したり、何らかの方法で堅固な BBB に隙間を作ろうとしたり、直接又は間接的にこの関門を通過させることを目標としてきた。一例として、Pardridge の「薬剤及び遺伝子の脳への送達 血管経路」(非特許文献 4 参照) が挙げられる。

#### 【0016】

従って、脳の炎症発生を治療・抑制するために、急性治療及び亜急性治療のいずれにも採用し得る治療法が必要となったのである。脳組織への侵襲も含めた副作用が最小限であるものが理想的な化合物(類)である。さらに、脳の炎症動物モデルにおいて脳脊髄液へ遊走する WBC 数の変化を観察する方法もまた必要とされている。

#### 【0017】

他方、支持療法や医療技術の進化にも関わらず、敗血症の致死率は依然として高いままである。敗血症は、心臓病以外の集中治療室における死亡原因の第一位を占めており、その発症例は増加している。敗血症への罹患例及び死亡例の多くは、細菌若しくは細菌産物に対する患者の過度の炎症反応に起因しているというのが、過去 20 年間に於ける最も一般的な見解であった。実際臨床的には、種々の臨床的に甚大な侵害要因に反応して顕在化する「全身性炎症反応症候群」(SIRS) として知られる症候群のうち 2 若しくは 3 以上の症状を呈するものを敗血症という。かかる症状には、 $38^{\circ}\text{C}$  を超える体温又は  $36^{\circ}\text{C}$  未満の体温や、90 回/分を超える脈拍数や、20 回/分を超える呼吸数、又は  $\text{PaCO}_2$  が 32 torr 未満 ( $4.3\text{ kPa}$ ) や、 $12000\text{ 細胞/mm}^3$  を超える白血球細胞数(白血球増加症)若しくは  $4000\text{ 細胞/mm}^3$  未満の白血球細胞数(白血球減少症)、又は総細胞数の 10% が幼若好中球又は桿状核好中球であること等が挙げられる。以上の内容を表 1 にまとめた。

#### 【0018】

【表 1】

**感染**：微生物の存在に対して、又は通常は無菌の宿主に微生物が侵入することに対して生じる炎症反応を特徴とする微生物現象。

**菌血症**：血中に一般細菌が存在すること。

**敗血症**：感染又は外傷に対する全身反応。かかる全身反応は、感染の結果として2若しくは3以上の症状（S I R S）（本文を参照のこと）を呈することにより顕在化する。

**重症敗血症**：臓器不全、血流低下、血圧低下を伴う敗血症。血流低下及び血流異常には乳酸アシドーシス、乏尿又は精神状態の急激な変化が含まれるが、これらに限定はされない。

**敗血症性ショック**：乳酸アシドーシス、乏尿又は精神状態の急激な変化が含まれるがこれらに限定されない血流異常及び血圧低下（適切な輸液投与にも関わらず）を伴う敗血症。強心剤又は昇圧剤を投与されている患者では、血流異常の検査時に血圧低下が認められない場合がある。

**敗血症に誘発される低血圧**：他に低血圧の要因がない場合のベースラインからの収縮期血圧が40mmHgを超え、90mmHg未満。

**多臓器不全症候群**：恒常性を維持できないほど病状が急激に悪化した患者において臓器機能の変化がみられること。

## 【0 0 1 9】

動物を使った前臨床試験では、敗血症にみられる炎症反応の抑制を目的とした薬剤において有望な初期効果がある程度認められた。しかし、かかる初期効果はその後の臨床研究において実証されていない。これまでに、（1）抗炎症治療法の採用、及び（2）抗エンドトキシン療法という二通りのアプローチがとられてきた。

## 【0 0 2 0】

抗炎症治療法においては、炎症性メディエーターの産生又はその生物効果を直接抑制する薬剤少なくとも3種がこれまでに見い出されている。それらの薬剤は、（1）糖質コルチコイド等のステロイド、（2）TNF- $\alpha$ やインターロイキン-1 $\beta$ などの炎症性サイトカインに対する拮抗剤又はブロッカー、及び（3）ブラジキニン等の炎症時に生成される産物又はプロスタグランジンや血小板活性化因子（PAF）等の炎症メディエーターに対する拮抗剤又はブロッカーである

。

## 【0021】

糖質コルチコイド等のステロイドについてみると、ハイドロコルチゾンを高量投与すると炎症反応を憎悪させるか、或いは全く効果を示さないが、低量投与では改善がみられることが明らかになっている。

## 【0022】

TNF- $\alpha$ やインターロイキン-1 $\beta$ 等の特異的サイトカインのブロックについてみると、TNF- $\alpha$ のモノクローナル抗体又は可溶性TNF- $\alpha$ 受容体の動物実験結果は有望だったものの、臨床試用においては無効であることが明らかになっている。さらに、インターロイキン-1 $\beta$ 受容体拮抗剤は、臨床試用において好結果が認められていない。

## 【0023】

最後に、血小板活性化因子(PAF)、ブラジキニン及びプロスタグランジン等、上記以外のメディエーターに特異的な炎症療法、並びにそれらに対する拮抗剤の使用もまた、臨床試用において効果を示していない。

## 【0024】

上記二番目の戦略は、血液循環における細菌産物に焦点をあて、細菌毒素を中和することにより宿主の炎症反応を抑制し、結果的に症状を改善するものである。抗血清、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体等を用いて行われる。

## 【0025】

動物を使った臨床試験では、いずれの戦略によっても宿主の炎症反応が抑制されたので、敗血症に対する臨床試用を行った。しかし、ステロイドを低量投与する方法以外は成果を出せなかった。これらの知見を表2にまとめた。また、かかるステロイド療法を行っても敗血症の致死率は高かった(35~50%)。敗血症の有効治療法の開発が今日に至るまで臨床における優先事項となっている。

## 【0026】

【表 2】

薬剤	効果	備考
糖質コルチコイド    ハイドロコルチゾン (100mg を静脈内投与、その後 0.18/mg/h) 有効 (8時間毎に100mg を静脈内投与)	無又は憎悪 有効	高量投与 低量投与
メディエーター特異的抗炎症療法		
抗TNF- $\alpha$ TNF- $\alpha$ のモノクローナル抗体 可溶性TNF- $\alpha$ 受容体	無 無又は憎悪	
抗インターロイキン-1 インターロイキン-1 受容体拮抗剤	無	
他のメディエーター特異的抗炎症療法		
抗PAF    PAF 受容体拮抗剤	無	
抗ブラジキニン    ブラジキニン拮抗剤	無	
抗プロスタグランジン    サイクロオキシゲナーゼ阻害剤	無	
抗エンドトキシン療法		
*    抗血清	無	
ポリクローナル抗体	無	
モノクローナル抗体	無	

\* : 抗エンドトキシン療法

## 【0027】

上述したような知見結果となったのは、前臨床試験において炎症の諸段階に抗炎症薬がどのように作用するかを観察を行えなかったためではないかと考えられる。

## 【0028】

従って、敗血症発症を治療・抑制するために採用し得る治療法が必要とされている。副作用が最小限であるものが理想的な化合物（類）である。

## 【0029】

## 【特許文献1】

特開昭63-258879号公報

## 【特許文献2】

特開平02-169583号公報

## 【特許文献3】

国際公開パンフレットWO9959964

## 【特許文献4】

欧州特許公開 2 8 7 4 7 1 公報

【特許文献 5】

米国特許第 6 2 2 1 8 8 0 号明細書

【特許文献 6】

米国特許第 6 1 9 4 4 3 2 号明細書

【非特許文献 1】

von Sprecher et al., Strategies in the design of peptidoleukotriene antagonists, J. Lipid Mediat. 6: 265-273 (1993)

【非特許文献 2】

Piper, Formation and actions of leukotrienes, Physiol. Rev., 64 (2): 744-61 (1984)

【非特許文献 3】

"Is There A Therapeutic Role For Blood-Brain Barrier Disruption" Ann. Int. Med. 93, 137-139, 1980

【非特許文献 4】

"Drug and gene delivery to the brain. The vascular route" Neuron, 36, 555-558, 2002

【0 0 3 0】

【発明が解決しようとする課題】

脳の炎症発生を治療・予防するために、脳の慢性炎症の治療に用いるだけでなく、急性期及び亜急性期の炎症にも適用できる治療法が医学分野において強く必要とされている。また、敗血症の発症を治療・予防するために、慢性敗血症の治療に用いるだけでなく、急性期及び亜急性期の敗血症にも適用できる治療法が医学分野において強く必要とされている。これらは非常に深刻かつ重大であり、また未だ満たされていない医学分野が抱える大きな課題である。本発明の課題は、従来技術が抱える上述の諸欠陥を克服することにある。より詳しくは、血管透過性亢進抑制剤やそのスクリーニング方法、前記血管透過性亢進抑制剤を有効成分とする脳の炎症や敗血症の発生予防又は症状改善剤、前記血管透過性亢進抑制剤を投与する脳の炎症や敗血症の発生又はその症状を治療又は抑制する方法を提供



することにある。

### 【0031】

#### 【課題を解決するための手段】

本発明者は、ロイコトリエン $C_4$ 及び $D_4$ 受容体拮抗剤、とりわけプランルカストを用いて、炎症メカニズムについての研究を行ってきた。その過程で、非ステロイド系抗炎症剤（NSAIDs）に分類され、末梢性鎮痛剤として広く知られるサイクロオキシゲナーゼ阻害剤（アスピリン等）は、ラット足底浮腫法において水分変位を計測することで抗浮腫を明らかにすることは困難であった。実際、イヌを使った実験では、オンマイヤーリザーバーに連結した脳室内留置カテーテルを通して $TNF-\alpha$ 及びインターロイキン-1を投与したところ、白血球細胞数の増加が認められた（それぞれ好中球、リンパ球の反応によって示される）。これらのサイトカインは、遅延してリンパ球数を亢進させるインターロイキン-6（2時間後に反応が生じ、10～24時間後にピークがきて24～72時間持続する）に比べると比較的早期反応性である。犬を使った実験では、かかる炎症性サイトカインが惹起する白血球増加症は上記阻害剤のいずれによっても抑制されなかった。これらの前臨床試験の結果は、臨床試用の結果と一致し、中枢神経系における炎症動物モデルが、炎症機構を研究する上で有用であることがわかった。そこで、前記オンマイヤーリザーバーに連結した脳室内留置カテーテルを通して、イヌ脳室内にIL-6を導入して（血管外にIL-6を注入し、敗血症様の状態として）炎症を起こさせる30分前に、プランルカストを1000mg/kg、500mg/kg、300mg/kgをそれぞれ経口投与しておいたところ、イヌ脳室内に何らの白血球細胞の漏出が認められなかった。これらの結果は、プランルカストがIL-6などの敗血症に起因する炎症を抑制することを示している。

### 【0032】

また、本発明者は、デキストランに誘発されたラット足底部の浮腫が、プランルカストにより投与量依存で抑制されたことを見い出した。プランルカスト450mg/kgを腹腔内投与したところ、デキストランに誘発された足底部浮腫は完全に抑制された。このことから、ロイコトリエン拮抗剤が毛細血管の内皮細胞

に作用し、デキストランに誘発されて亢進した毛細血管透過性の亢進を抑制した可能性が示唆された。毛細血管中の内皮細胞には、間隙、小孔及びピノサイトーシス小胞等の開口部が数多くあるにも関わらず、プランルカストはその透過性を抑制した。脳毛細血管の内皮細胞はタイトジャンクションで接合し、堅固なため、他の毛細血管より開口部は少ない。従ってプランルカストは、他の毛細血管においてよりも脳毛細血管における透過性の抑制に、より効果を示すことが示唆された。以上のことから、かかる機構が中枢神経系レベルでも機能するとの仮説をたてた。

### 【0033】

脳の炎症治療におけるロイコトリエン拮抗剤の役割を考察するため、中枢神経系での炎症を測定する高感度な定量法を開発した。この方法によると、アラキドン酸によって生じる血液脳関門の透過性及び白血球細胞（WBC）の脳脊髄液への遊走の両方を同じ実験動物を用いて経時的に測定できることから、炎症過程における重要な変化の観察が可能になる。この方法により、特にロイコトリエンC<sub>4</sub>及びD<sub>4</sub>拮抗剤プランルカストの効果を脳の炎症について調べたところ、侵害刺激としてアラキドン酸を投与すると、血液脳関門の透過性や白血球細胞の遊走という炎症過程における変化、すなわち、脳毛細血管中の内皮細胞の透過性亢進や白血球細胞の遊走が、プランルカストによる阻止が観察された。これらの観察結果から、プランルカストが血液脳関門を通過せず若しくは殆ど通過することなく、毛細血管の管腔構造を構成する血管内皮細胞に作用し、毛細血管内の血漿成分、血球等の組織への漏出を防ぐ作用を有することを見出し、本発明を完成するに至った。プランルカスト等の血液脳関門を殆ど通過しないロイコトリエンC<sub>4</sub>及びD<sub>4</sub>受容体拮抗剤が、血液脳関門を通過して組織内にデリバリーされることなく、脳毛細血管の内皮細胞に作用し、内皮細胞の収縮を抑制し、毛細血管内の血漿成分、血球等の組織への漏出を防ぐ作用を有するとの知見はこれまで報告されておらず、したがって、脳の炎症あるいは敗血症の治療・抑制目的としてはおろか予防にさえこれまで用いられたことは報告されていない。

### 【0034】

すなわち本発明は、血液脳関門を通過せず若しくは殆ど通過することなく、毛

細血管の血管内皮細胞に作用し、毛細血管内の血漿成分、血球等の組織への漏出を防ぐことができる哺乳動物における血管透過性亢進抑制剤（請求項 1）や、哺乳動物がヒトである請求項 1 記載の血管透過性亢進抑制剤（請求項 2）や、ロイコトリエン C<sub>4</sub> 及び D<sub>4</sub> 受容体拮抗剤又はその薬理学的に許容される塩を有効成分とする請求項 1 又は 2 記載の血管透過性亢進抑制剤（請求項 3）や、ロイコトリエン C<sub>4</sub> 及び D<sub>4</sub> 受容体拮抗剤がプラニルカストである請求項 3 記載の血管透過性亢進抑制剤（請求項 4）や、非ヒト哺乳動物の脳の硬膜を貫通させクモ膜下腔に挿入したカニューレを介して、炎症誘発剤をクモ膜下腔に導入する前後に、被検物質を前記非ヒト哺乳動物に投与し、前記カニューレを介して回収した脳脊髄液量を測定することを特徴とする血管透過性亢進抑制剤のスクリーニング方法（請求項 5）や、非ヒト哺乳動物がラット、犬、猫又はウサギである請求項 5 記載の血管透過性亢進抑制剤のスクリーニング方法（請求項 6）や、炎症誘発剤がアラキドン酸、プロスタグランジン、トロンボキサン、ヒスタミン、イースト、L P S、デキストラン、ブラジキニン、カラゲニン、ロイコトリエン、T N F -  $\alpha$ 、I L - 1  $\beta$  又は I L - 6 である請求項 5 又は 6 記載の血管透過性亢進抑制剤のスクリーニング方法（請求項 7）や、被検物質が抗炎症剤から選ばれる請求項 5 ～ 7 のいずれか記載の血管透過性亢進抑制剤のスクリーニング方法（請求項 8）や、被検物質を経口、皮下、腹腔内又は静脈内投与する請求項 5 ～ 8 のいずれか記載の血管透過性亢進抑制剤のスクリーニング方法（請求項 9）や、脳脊髄液量とともに、脳脊髄液中の白血球細胞数を測定する請求項 5 ～ 9 のいずれか記載の血管透過性亢進抑制剤のスクリーニング方法（請求項 1 0）や、経時的に脳脊髄液を回収する請求項 5 ～ 1 0 のいずれか記載の血管透過性亢進抑制剤のスクリーニング方法（請求項 1 1）に関する。

#### 【 0 0 3 5 】

また本発明は、請求項 1 ～ 4 のいずれか記載の血管透過性亢進抑制剤を有効成分とする脳の炎症の発生予防又は症状改善剤（請求項 1 2）や、脳の炎症が脳浮腫である請求項 1 2 記載の脳の炎症の発生予防又は症状改善剤（請求項 1 3）や、脳の炎症が脳梗塞である請求項 1 2 記載の脳の炎症の発生予防又は症状改善剤（請求項 1 4）や、脳の炎症が感染症に起因する炎症である請求項 1 2 記載の脳

の炎症の発生予防又は症状改善剤（請求項 15）や、脳の炎症が脳外傷に起因する炎症である請求項 12 記載の脳の炎症の発生予防又は症状改善剤（請求項 16）や、脳外傷が外科手術によるものである請求項 16 記載の脳の炎症の発生予防又は症状改善剤（請求項 17）や、脳手術に先立って投与されることを特徴とする請求項 12 記載の脳の炎症の発生予防又は症状改善剤（請求項 18）に関する。

### 【0036】

さらに本発明は、請求項 1～4 のいずれか記載の血管透過性亢進抑制剤を有効成分とする敗血症の予防及び／又は症状改善剤（請求項 19）や、敗血症が重症急性呼吸器症候群（SARS）である請求項 19 記載の敗血症の予防及び／又は症状改善剤（請求項 20）や、請求項 1～4 のいずれか記載の血管透過性亢進抑制剤を、必要とする哺乳動物に治療有効量投与することからなる哺乳動物における脳の炎症の発生又はその症状を治療又は抑制する方法（請求項 21）や、脳の炎症が脳浮腫である請求項 21 記載の方法（請求項 22）や、脳の炎症が脳梗塞である請求項 21 記載の方法（請求項 23）や、脳の炎症が感染症に起因する炎症である請求項 21 記載の方法（請求項 24）や、脳の炎症が脳外傷に起因する請求項 21 記載の方法（請求項 25）や、脳外傷が外科手術によるものである請求項 25 記載の方法（請求項 26）や、脳手術に先立って投与されることを特徴とする請求項 21 記載の方法（請求項 27）や、ロイコトリエン C<sub>4</sub>及び D<sub>4</sub>受容体拮抗剤の治療有効量が、5 mg～900 mgであることを特徴とする請求項 21～27 のいずれか記載の方法（請求項 28）や、脳脊髄液における白血球細胞数が正常値に達するまで継続することを特徴とする請求項 21～28 のいずれか記載の方法（請求項 29）や、治療有効量のロイコトリエン C<sub>4</sub>及び D<sub>4</sub>受容体拮抗剤又はその薬理学的に許容される塩を患者に投与することからなる侵襲脳手術の前に患者に対して行う前処置方法（請求項 30）や、請求項 1～4 のいずれか記載の血管透過性亢進抑制剤を、必要とする哺乳動物に治療有効量投与することからなる哺乳動物における敗血症の発生又はその症状を治療又は抑制する方法（請求項 31）や、敗血症が重症急性呼吸器症候群（SARS）である請求項 31 記載の方法（請求項 32）や、ロイコトリエン C<sub>4</sub>及び D<sub>4</sub>受容体拮抗剤の治療有

効量が、5mg～900mgであることを特徴とする請求項31又は32記載の方法（請求項33）に関する。

#### 【0037】

##### 【発明の実施の形態】

本発明の血管透過性亢進抑制剤としては、ヒト等の哺乳動物において、血液脳関門を通過せず若しくは殆ど通過することなく、毛細血管の血管内皮細胞に作用し、毛細血管内の血漿成分、血球等の組織への漏出を防ぐことができるものであればどのようなものでも良く、これら本発明の血管透過性亢進抑制剤は後述する本発明の血管透過性亢進抑制剤のスクリーニング方法により得ることができるが、具体的には、プラニルカスト、ザフィルルカスト、モンテルカスト等のロイコトリエンC<sub>4</sub>又はD<sub>4</sub>受容体拮抗剤又はその薬理学的に許容される塩を挙げることができ、中でもプラニルカストを好適に例示することができる。上記ロイコトリエンC<sub>4</sub>又はD<sub>4</sub>受容体拮抗剤の薬理学的に許容される塩としては、リチウム、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属類、マグネシウム、カルシウム等のアルカリ土金属類、他にアルミニウム等を例示することができる。

#### 【0038】

本発明の血管透過性亢進抑制剤のスクリーニング方法としては、ラット、犬、猫、ウサギ等の非ヒト哺乳動物の脳の硬膜を貫通させクモ膜下腔に挿入したカニューレを介して、炎症誘発剤をクモ膜下腔に導入する前後に、被検物質を前記非ヒト哺乳動物に投与し、前記カニューレを介して回収した脳脊髄液量を測定する方法であれば特に制限されるものではなく、上記炎症誘発剤としてはアラキドン酸、プロスタグランジン、トロンボキサン、ヒスタミン、イースト、LPS、デキストラン、ブラジキニン、カラゲニン、ロイコトリエン、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6等を例示することができるが、成分の均質性の点でアラキドン酸等の低分子化合物が好ましい。また、上記被検物質としては、種々のを例示することができるが、プラニルカスト等のロイコトリエン拮抗剤が好ましい。被検物質の非ヒト動物への投与方法としては特に制限されず、例えば、被検物質の化学的物性（脂溶性など）を考慮して、経口投与、皮下投与、腹腔内投与、静脈内投与など公知の投与方法から適宜選択すれば良い。被検物質が、毛細血管の管腔構

造を構成する血管内皮細胞の内腔に作用し、毛細血管内の血漿成分、血球等の組織への漏出を防ぐことができる物質かどうかの評価は、脳脊髄液量を測定することにより行うことができるが、脳脊髄液量とともに、脳脊髄液中の白血球細胞数を測定することが好ましい。またこれらの測定は、30分あるいは1時間毎など経時的に脳脊髄液を回収し、被検物質未投与のコントロールと比較・評価することにより実施することが好ましい。すなわち、コントロールにおいて観察される脳脊髄液の滲出と脳脊髄液中の白血球の存在が、被検物質投与することにより抑制された場合、かかる被検物質は血管透過性亢進抑制剤とすることができ、被検物質の投与が炎症誘発剤の導入前であれば血管透過性亢進抑制の予防剤として、被検物質の投与が炎症誘発剤の導入後であれば血管透過性亢進抑制の改善剤として有用である。

#### 【0039】

ところで、上記本発明の血管透過性亢進抑制剤のスクリーニング系や前記オンマイヤーリザーバーに連結した脳室内留置カテーテルを用いる系において、アラキドン酸やIL-6等の炎症誘発剤を用いることなく、被検物質のみを投与した場合、脳脊髄液中の被検物質量をELISA等の公知の方法で測定することにより、被検物質が血液脳関門を通過しうる物質かどうかを簡便に判定することができる。かかる判定方法は、脳における治療をターゲットとした医薬物質のスクリーニングにきわめて有用である。この場合、脳脊髄液量を確実に確保しうる観点から、ラットよりもイヌの方が好ましい。

#### 【0040】

これら本発明の血管透過性亢進抑制は、脳の炎症や敗血症の発生予防及び／又は症状改善剤として有利に用いることができる。炎症は、第1段階（急性一過性段階）：血管拡張及び毛細血管透過性の亢進と、第2段階（遅発性の亜急性段階）：白血球及び食細胞の遊走と、第3段階（慢性増殖段階）：中枢においては細胞の壊死、それに引き続きグリア細胞に置き換えられる。末梢においては変性及び線維症の各段階に大別することができるが、本発明の脳の炎症や敗血症の発生予防及び／又は症状改善剤は、上記炎症過程の第1段階において、末梢及び中枢における後毛細血管細動脈の内皮細胞に働き、血管透過性亢進を抑制し、末梢性

及び中枢性の炎症を抑制し、その結果血中成分の漏出を防止又は抑制する。かかる抗炎症作用機構の効果は独特であり、従前の抗炎症療法や抗エンドトキシン療法と明確に区別することができる。

#### 【 0 0 4 1 】

上記脳の炎症としては、脳毛細血管から白血球等の組織への漏出に起因する疾病であれば特に制限されるものではなく、例えば、脳浮腫や脳梗塞や感染症に起因する脳の炎症や、外科手術、事故等による脳外傷に起因する脳の炎症を挙げることができ、脳手術に先立って、手術前の処置として投与されるなど脳の炎症の発生予防剤を好適に例示することができる。上記感染症に起因する脳の炎症としては、インフルエンザ脳症、西ナイル熱による脳症、クモ膜炎等を含む脳膜炎などを挙げることができる。

#### 【 0 0 4 2 】

また、本発明における敗血症とは、各種細菌に起因する疾患の他、便宜上ウイルスに起因する疾患をも含み、したがって本発明における敗血症としては、これら細菌やウイルスの感染症であれば制限されないが、サルモネラ菌 (*Salmonella enteritidis*) やボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) 等種々の細菌に起因する食中毒や、コロナウイルス (*Coronavirus*) により引き起こされる重症急性呼吸器症候群 (SARS) も好適に例示することができる。SARSを引き起こすコロナウイルスは短期間に変異するため、有効なワクチンを作製することは困難であり、本発明の敗血症の予防及び／又は症状改善剤をSARSに感染したことが明らかになったときに投与すると、重篤な症状に陥ることがない。

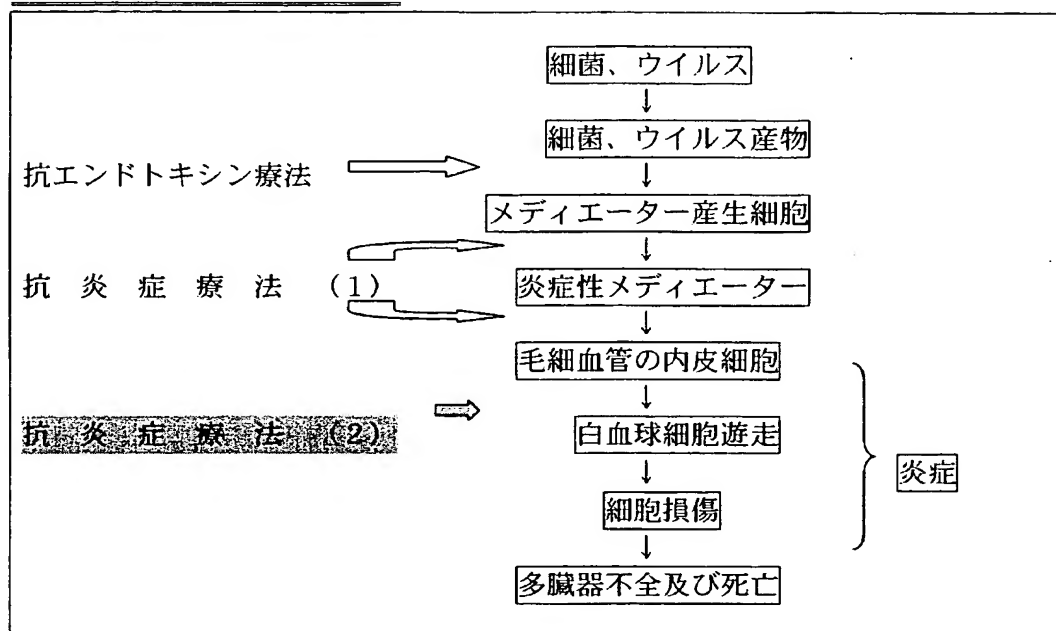
#### 【 0 0 4 3 】

本発明の血管透過性亢進抑制剤が敗血症の治療に有用と考えられる根拠を表3に示す。表3から、プラニルカスト等の本発明の血管透過性亢進抑制剤は、後毛細血管細動脈の内皮細胞に作用する新しいタイプの抗炎症剤であり、プラニルカスト等の本発明の血管透過性亢進抑制剤の使用により、中枢性及び末梢性いずれの炎症も抑制する敗血症の新療法が提供されることがわかる。

#### 【 0 0 4 4 】

【表 3】

敗血症治療法の作用機構



【0045】

本発明の血管透過性亢進抑制剤は、ヒト等の哺乳動物における脳の炎症や敗血症の発生又はその症状を治療又は抑制する方法に有利に用いることができる。かかる本発明の脳の炎症や敗血症の発生又はその症状を治療又は抑制する方法を実施するにあたり、障害或いは症状の急性管理又は慢性管理に用いる本発明の血管透過性亢進抑制剤の予防投与量又は治療投与量は、治療対象の症状の程度及び投与経路によって異なる。投与量及び投与回数もまた、個々の患者の年齢、体重及び反応性によって異なる。一般的に、軽症度の外傷、又は脳手術の手術前投与に用いるロイコトリエン拮抗剤の1日あたりの経口投与量の適切範囲は、当該技術の専門家であれば容易に決められることである。例えば、喘息治療に用いられる既知のロイコトリエン阻害剤において現在採用されている適切投与量に関しては、“Physician’s Desk Reference” (54. sup. th Edition, Medical Economics Company Inc., 2000) を参照することができる。ロイコトリエン受容体拮抗剤の1日あたりの経口投与量は、症状によって適宜選択することができるが、5mgから900mgの範囲が好ましい。具体的には、プラニルカストであれば50m



g/日～1200mg/日が好ましく、より好ましくは125mg/日～800mg/日、さらに好ましくは200mg/日～800mg/日である。シングレアであれば5mg/日～100mg/日が好ましく、より好ましくは5mg/日～50mg/日、さらに好ましくは10mg/日～20mg/日である。ザフィルクラストであれば10mg/日～300mg/日であり、より好ましくは20mg/日～150mg/日、さらに好ましくは40mg/日～80mg/日である。しかし、より重篤な外傷に対しては、さらに高量の投与をすべきである。

#### 【0046】

子供、65歳以上の患者、腎臓機能若しくは肝臓機能が不全の患者に対しては、低投与量から始め、その後の個々人の反応又は血中濃度の結果から増量していくことが推奨される。当該技術分野の専門家にとっては自明であるが、上記の範囲外の投与量が必要となる事例もある。また、臨床家や治療に携わる医師は、患者個々人の反応を考慮の上、治療を適用、中断又は終了する方法及び時期を把握していることにも留意すべきである。

#### 【0047】

現在使用されているロイコトリエン拮抗剤各種は、胃酸中で溶解することが必要とされるため、経口投与が今日最も一般的な投与形態である。その投与形態としては、錠剤、トローチ剤、カプセル剤、ゲルカップ、ドロップ剤等が挙げられる。投与が簡便なことから、錠剤とカプセル剤が最も有利な経口投与単位であり、その場合、製剤用固形担体を加えてもよい。患者が意識不明状態にあるときは、カニユーレを胃に導入して投与することが好ましい。必要に応じて標準的な水性又は非水性技術により錠剤にコーティングを施してもよい。現在使用されているロイコトリエン拮抗剤のうち、少なくとも一種、すなわちモンテルカストは、静脈内投与が可能である。投与は1日2～3回行えるが、1日1回の投与が好ましい。脳脊髄液中のWBC数が正常値に達した時点で投与を中止してもよい。

#### 【0048】

##### 【実施例】

本発明の方法に用いる組成物（類）の調製及びその有用性に関して詳述する以下の実施例を参照しながら、本発明をさらに説明する。本発明の範囲を逸脱する

ことなく、材料及び方法のいずれについても多々修正を加えて実施し得ることは、当該分野の専門家にとっては自明である。

#### 【0 0 4 9】

##### 実施例 1：末梢での考察

本発明者は、デキストランに誘発されたラット足底部の浮腫が、プランルカストにより投与量依存で抑制されたことを見出した。プランルカスト 4 5 0 m g / k g を経口投与したところ、デキストランに誘発された足底部浮腫は完全に抑制された（図 1）。

#### 【0 0 5 0】

上記のことから、ロイコトリエン拮抗剤が毛細血管の内皮細胞に作用し、デキストランに誘発されて亢進した毛細血管透過性を抑制した可能性が示唆された。毛細血管中の内皮細胞には、間隙、小孔及びピノサイトーシス小胞等の開口部が数多くあるにも関わらず、プランルカストはその透過性を抑制した。脳毛細血管の内皮細胞は細胞間の接合が堅固なため、他の毛細血管より開口部は少ない。従ってプランルカストは、他の毛細血管においてよりも脳毛細血管における透過性の抑制に、より効果を示すことが示唆された。以上のことから、かかる機構が中枢神経系レベルでも機能するとの仮説をたてた。

#### 【0 0 5 1】

##### 実施例 2：炎症過程における変化の測定

脳の炎症治療におけるロイコトリエン拮抗剤の役割を考察するため、中枢神経系での炎症を測定する高感度な定量法を開発した。アラキドン酸によって生じる血液脳関門の透過性及び白血球細胞の脳脊髄液への遊走の両方を同じ実験動物を用いて経時的に測定できることから、炎症過程における重要な変化の観察が可能になる。この方法により、特にロイコトリエン C<sub>4</sub> 及び D<sub>4</sub> 拮抗剤プランルカストの効果を脳の炎症について調べた。侵害刺激としてアラキドン酸を投与すると、血液脳関門の透過性や白血球細胞の遊走という炎症過程における変化が観察された。

#### 【0 0 5 2】

##### 方法及び材料

5 0 m g / k g のペントバルビタールナトリウムを体重約 3 5 0 ~ 4 0 0 g の雄ラットに腹腔内投与 ( i . p . ) して麻酔した。これらのラットを定位固定装置に置き、頭頂部から首にかけて剃毛した。実験部位をまず 7 0 % エタノールで、次に 1 0 % プロビドン- ヨウ素溶液で消毒した。頸髄上の皮膚及び筋肉を頸椎が露出するまで切開した。大槽を通り硬膜を貫通するように 2 3 G 3 / 4 針で穿刺した。2 ~ 3 m m P E 1 0 カニユーレ ( 内径 0 . 0 1 1 " 、厚さ 0 . 0 0 7 " 、外径 0 . 0 2 4 " 、長さ 6 . 5 c m ) の一方を、神経組織を損傷しないように頸髄のクモ膜下腔に挿入した ( 図 2 ) 。カニユーレをシアノアクリル接着剤で末梢組織に固定した。P E 1 0 カニユーレのもう一方を使ってアラキドン酸 ( A A 、 3 . 2 5  $\mu$  g / 2  $\mu$  l ) 等の侵害刺激剤を投与し、さらにその後 1 1 時間の実験期間にわたり 3 0 分毎に脳脊髄液を回収するのにも使用した。カニユーレは挿入直後に脳脊髄液で満たされた。

#### 【 0 0 5 3 】

クモ膜下腔にアラキドン酸を投与するために空気を注入した。切開した筋肉と皮膚を外科用ステープルで接合した後、ラットを定位固定装置から取り出し、温熱パッド上に置いて連続観察した。アラキドン酸投与の 3 0 分前にロイコトリエン C<sub>4</sub> 及び D<sub>4</sub> 拮抗剤 プランルカストを投与し ( 4 5 0 m g / k g 、 i . p . ) 、相互作用実験を行った。麻酔が切れかかったら、さらに 0 . 0 5 ~ 0 . 1 m l のペントバルビタールを投与した ( 5 0 m g / m l 、 i . p . ) 。実験中、ラットに苦痛の様子がみられたら、直ちに実験を中止して安楽死させた。実験終了後、化学蒸気フード内の密閉ジャーの中で高濃度ハロタンガスに曝すことにより、ラットを安楽死させた。

#### 【 0 0 5 4 】

##### 結果

クモ膜下腔へのアラキドン酸 ( 3 . 2 5  $\mu$  g / 2  $\mu$  l ) 投与直後に、脳脊髄液容量が増加した。脳脊髄液量は、3 . 5 時間以内にピークに達した ( 図 3 A 及び図 3 B ) 。アラキドン酸投与後 4 ~ 5 時間の内に脳脊髄液量は徐々に減少していったが、上記投与量で投与した場合は、1 1 時間の観察期間にわたって持続レベルを保っていた。投与後 3 0 分間は、白血球細胞の遊走は認められず、脳の炎症

の急性一過性段階であることが示唆されたが、その後徐々に遊走の亢進が認められた（図 3 A 及び 3 B）。総白血球細胞数及び脳脊髄液量は、その後共に増減しながら変化した。このことから、白血球及び食細胞の遊走を最大の特徴とし、遅発性に生じる亜急性段階に移行したことが示唆される。対照動物では、脳脊髄液量も白血球細胞数も増加しなかったが、これが正常な状態である。というのは、中枢神経系内圧は非常に低く（6～10 mmHg）、通常、脳脊髄液中に白血球細胞は存在しないからである。

#### 【0055】

アラキドン酸（3.25  $\mu$ g / 2  $\mu$ l）投与の30分前に、ロイコトリエンC<sub>4</sub>及びD<sub>4</sub>受容体拮抗剤プランルカストを事前腹腔内投与（450 mg / kg）したところ、脳脊髄液の増加が完全に抑制された（n=4）（図4）。このことから、脳毛細血管中の内皮細胞の透過性亢進や白血球細胞の遊走が、プランルカストにより阻止されたことが示唆される。

#### 【0056】

実施例3：ロイコトリエン受容体拮抗剤プランルカストの効果の考察

脳の炎症時における脳毛細血管の内皮細胞透過性の亢進及び脳脊髄液への白血球細胞遊走の評価

上記の方法により、同じラットを使って透過性の経時的な変化を測定することが可能となる。今まで同じ動物を使って脳の炎症を測定できる方法はなかった。そのため、所定の実験期間毎に最低でも4匹の動物を犠牲にしなければならなかった（統計上の有意を確保するため）。例えば、10時間にわたり30分毎に脳の炎症の様子を調べる必要があれば（30分毎にn=4）、80匹のラットを屠殺しなければならない。この方法に従えば、脳毛細血管の透過性の変化だけでなく、中枢神経系に遊走する白血球細胞数の変化についても調べることができる。

#### 【0057】

この方法によると4匹のラットを供するだけで、中枢神経系への白血球細胞の遊走量に関するデータが得られ、その結果、それぞれの期間毎に動物個体間で生じる差異も回避できる。脳毛細血管の透過性及び中枢神経系への白血球細胞の遊

走の両方について定量できるのは、この方法によってのみであり、脳の炎症過程のより完全な像を描くことができるのである。

#### 【0058】

本発明によれば、11時間にわたり30分毎に、同じラットを用いて脳脊髄液(CSF)の容量( $\mu$ l)及び脳脊髄液中の白血球細胞(WBC)数を測定した。ペントバルビタール麻酔下においてカニューレ(PE10)の一方を、神経を損傷しないようにラットのクモ膜下腔に挿管した(図2)。脳組織が損傷を受けると脳脊髄液の容量とWBC数は、アラキドン酸を投与することなく直ちに増加する。正常ラットの脳脊髄液中にWBCは存在しないことから、カニューレ挿管直後の脳脊髄液中にWBCが存在しないラットだけを使用した。カニューレのもう一方は開口したままで、侵害刺激剤(アラキドン酸、LPS、デキストランなど)を投与したり、その後の実験期間において30分毎に脳脊髄液を回収することに利用した。脳脊髄液の容量はマイクロピペットを用いて測定し、脳脊髄液中のWBC数は、血球計により計測した。

#### 【0059】

アラキドン酸( $3.2\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ )を投与するとその直後から脳脊髄液が増加し、3.5時間以内に最大値 $100\sim120\mu\text{l}$ に達した。その後減少したが、投与後4~5時間における30分毎の値は $60\sim80\mu\text{l}$ を保っていた。白血球細胞は、アラキドン酸投与後30分間は認められなかったが、その後徐々に増加した。

#### 【0060】

クモ膜下腔にアラキドン酸を投与する30分前にプランルカスト( $450\text{mg}/\text{kg}$ )を腹腔内投与した。プランルカストは、脳脊髄液の増加を完全に抑制し、WBC遊走に基づいて調べた脳毛細血管透過性の亢進も抑制した。

#### 【0061】

本方法では、前述したとおり第1及び第2炎症段階の特性を明らかにした。すなわち、局所的血管拡張及び毛細血管透過性の亢進が特徴の急性一過性段階(第1段階)と、白血球及び食細胞の遊走を最大の特徴とする遅発性に生じる亜急性段階(第2段階)である。

## 【0 0 6 2】

間隙、小孔及び数多くのピノサイトーシス小胞がある通常の毛細血管と異なり、脳毛細血管ではピノサイトーシス小胞が比較的少なく、ミトコンドリアが著しく多く、また毛細血管内部にタイトジャンクションがみられる。ロイコトリエン受容体拮抗剤がBBBを透過したとしても、その量は極微量である。このことから、ロイコトリエン受容体拮抗剤が、脳毛細血管の内皮細胞の透過性を末梢抑制(peripheral inhibition)していることが示唆される。内皮細胞は、互いに緊密に隣接し合い、タイトジャンクションを形成している。脳毛細血管の「内側」にある内皮細胞では、通常の毛細血管における内皮細胞に比べ、遥かに漏出が生じにくくなっている。何故なら、通常の毛細血管には間隙による経路があり、また小孔や数多くのピノサイトーシス小胞が存在しているからである。

## 【0 0 6 3】

毛細血管腔とBBBの間の内皮細胞の透過性を末梢抑制することによって、ロイコトリエンC<sub>4</sub>及びD<sub>4</sub>受容体拮抗剤による脳の炎症治療が可能となることが考えられる。そこで、薬剤がBBBを通過できることや、脳の炎症部位に薬剤を到達させるためにBBBを開放させることよりも、脳毛細血管透過性を低減させる能力及びWBCの中樞神経系への遊走を抑制する能力の方が、治療上、より重要とされる。BBBが一旦開くとBBBの透過性は亢進し、脳毛細血管内圧の方が頭蓋内圧より高いために脳浮腫が生じることになるのである。

## 【0 0 6 4】

上記の方法から以下のような知見が新たに得られた。

- (1) この方法により、炎症過程(第1段階及び第2段階)を経時的に定量することが可能になる。また、
- (2) プランルカストは、脳の二次損傷も抑制する。

## 【0 0 6 5】

実施例4：脳外傷ラットモデルにおけるプランルカスト及び他の抗炎症剤の効果  
両頸動脈を30分間可逆的に閉塞し、その後再灌流させた虚血ラットモデルが、プランルカストを事前投与することにより延命した。閉塞を起こす30分前にプランルカストを投与(450mg/kg、i.p.)したところ、4～5匹の

ラット中 1 匹が 1 週間生存した。さらに、無処理犬にプラニルカストを事前投与（異なる 3 種類の投与量で投与）したところ、サイトカインに誘発された脳脊髄液中への W B C 遊走の亢進が抑制された。

#### 【 0 0 6 6 】

##### 【発明の効果】

本発明者は、アラキドン酸（ $3.25 \mu\text{g} / 2 \mu\text{l}$ ）に誘発される脳の炎症が、ロイコトリエン  $C_4$  及び  $D_4$  拮抗剤のプラニルカストを投与（ $450 \text{mg} / \text{kg}$ 、i. p.）することにより完全に抑制されることを見出した。かかる炎症は、B B B の透過性の亢進及び脳脊髄液中への白血球細胞の遊走によって引き起こされる。従って、ロイコトリエン  $C_4$  及び  $D_4$  拮抗剤（プラニルカスト）は、脳梗塞等の疾患、脳外傷及び脳手術によって生じる脳の炎症に対する治療に有用であることがわかる。

#### 【 0 0 6 7 】

本発明の性質を実施例により十分に説明したので、現在の知識をもってすれば、過度の実験を実施したり包括的概念を逸脱することなく容易に本発明に修正を加え、及び／又は実施例に種々の応用を適用することは、第三者にとって容易である。したがって、かかる適用や修正は、本発明に開示された実施例の均等物の意味及び範囲を逸脱してはならず、また逸脱しないように意図すべきである。本明細書における表現又は用語は、本発明を説明することを目的としており、限定的に用いているのではないことに留意すべきである。本発明に開示した種々の機能を実施するための方法、材料及び工程は、本発明を逸脱しない限りにおいて種々の変更が可能である。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図 1】

デキストランに誘導されるラット足底浮腫に対する ONO-1078（プラニルカスト）の作用を示す図である。

##### 【図 2】

脳の炎症実験でラットの脳脊髄液の変化を測定する際のカニューレの位置を示す図である。

**【図 3】**

アラキドン酸投与により、個体二匹の中樞神経系（CNS）に炎症が発生したことを示す図である。3 Aはラット# 1、そして3 Bはラット# 2である。

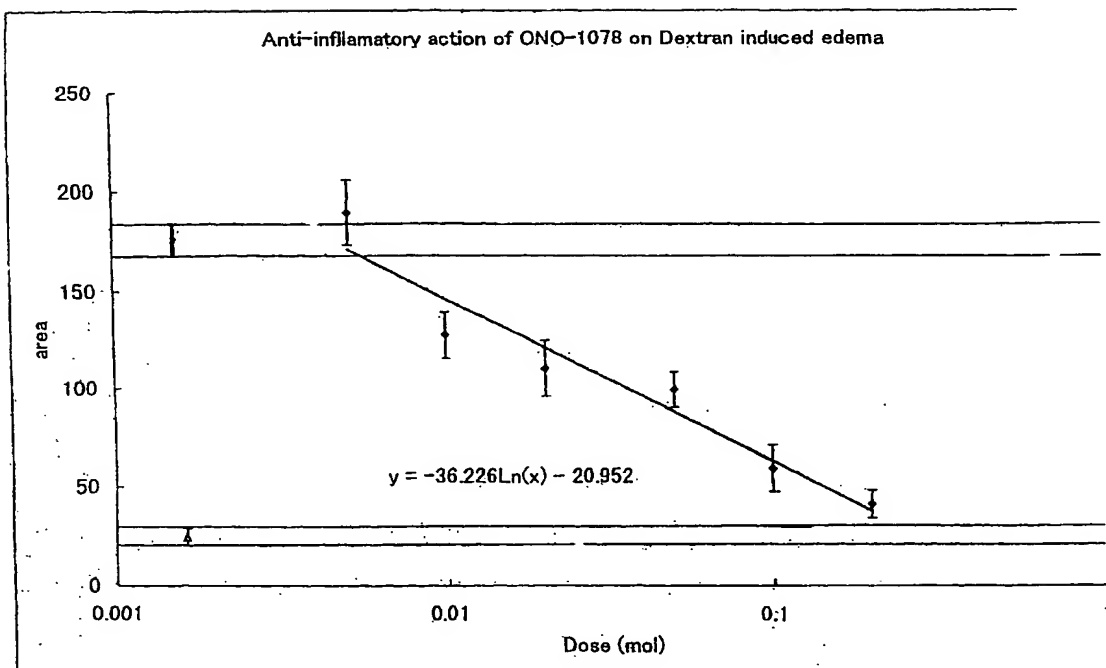
**【図 4】**

ラット中樞神経系（CNS）においてアラキドン酸投与により誘発される炎症に対するプラニルカストの抑制効果を示す図である。

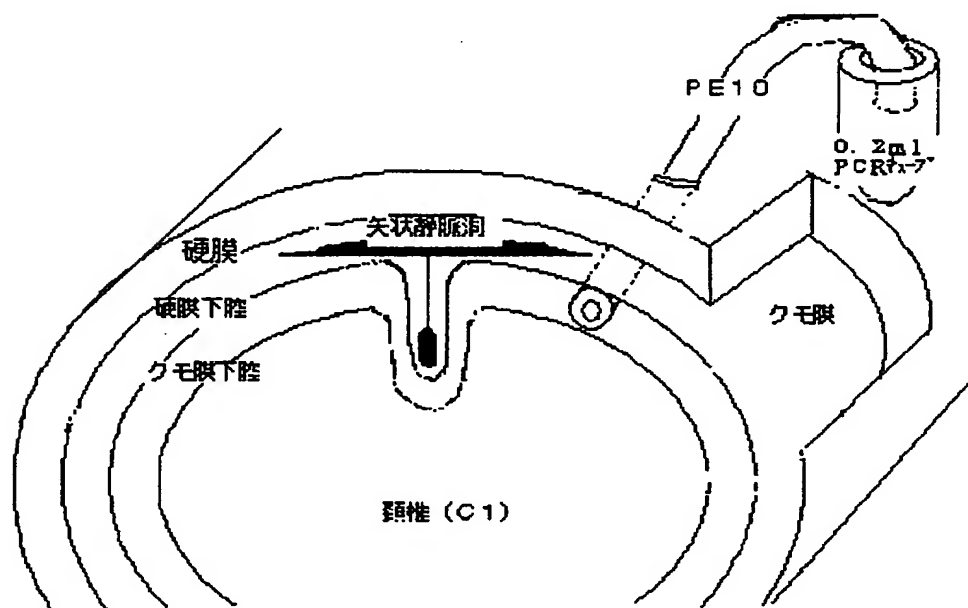


【書類名】 図面

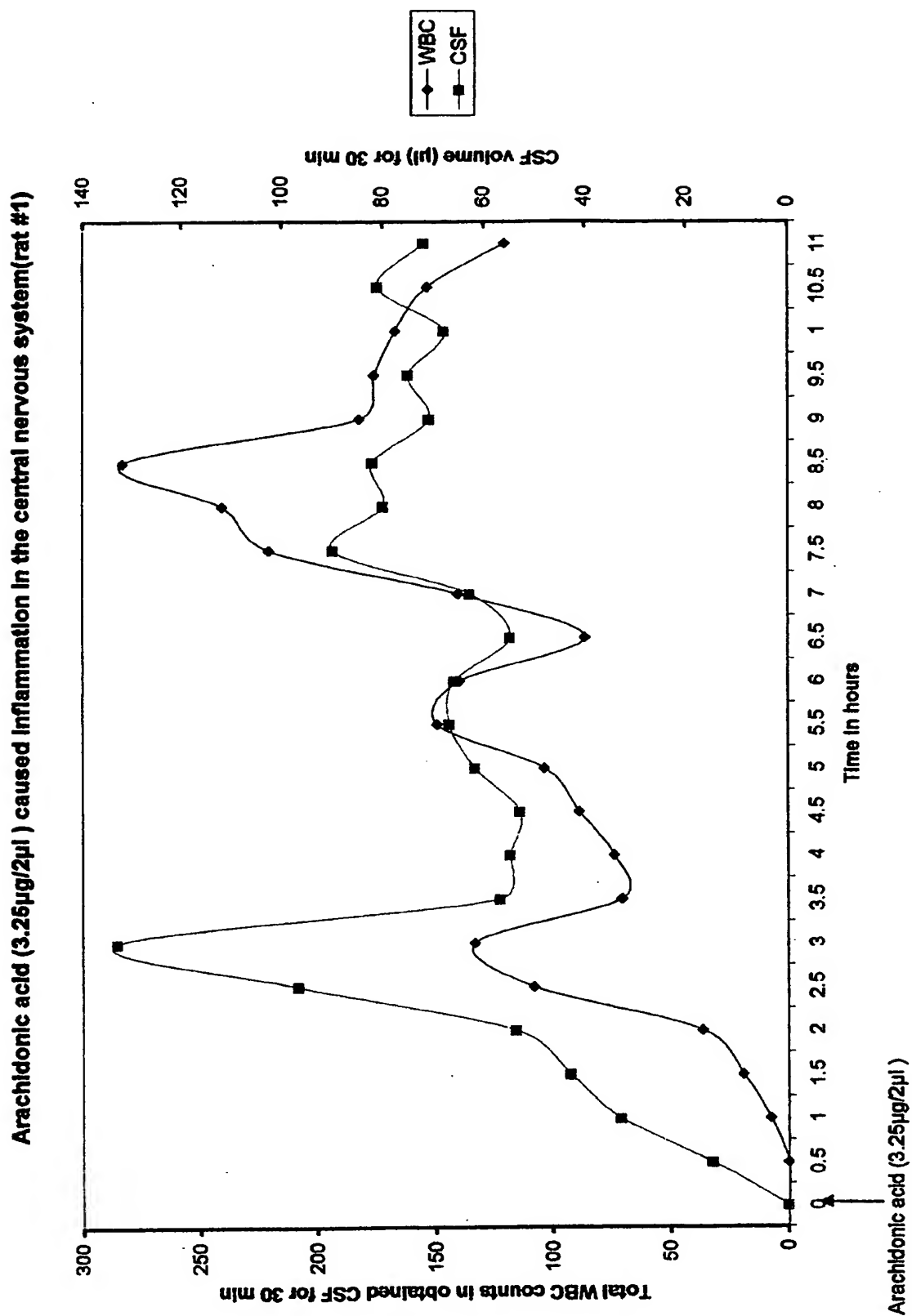
【図 1】



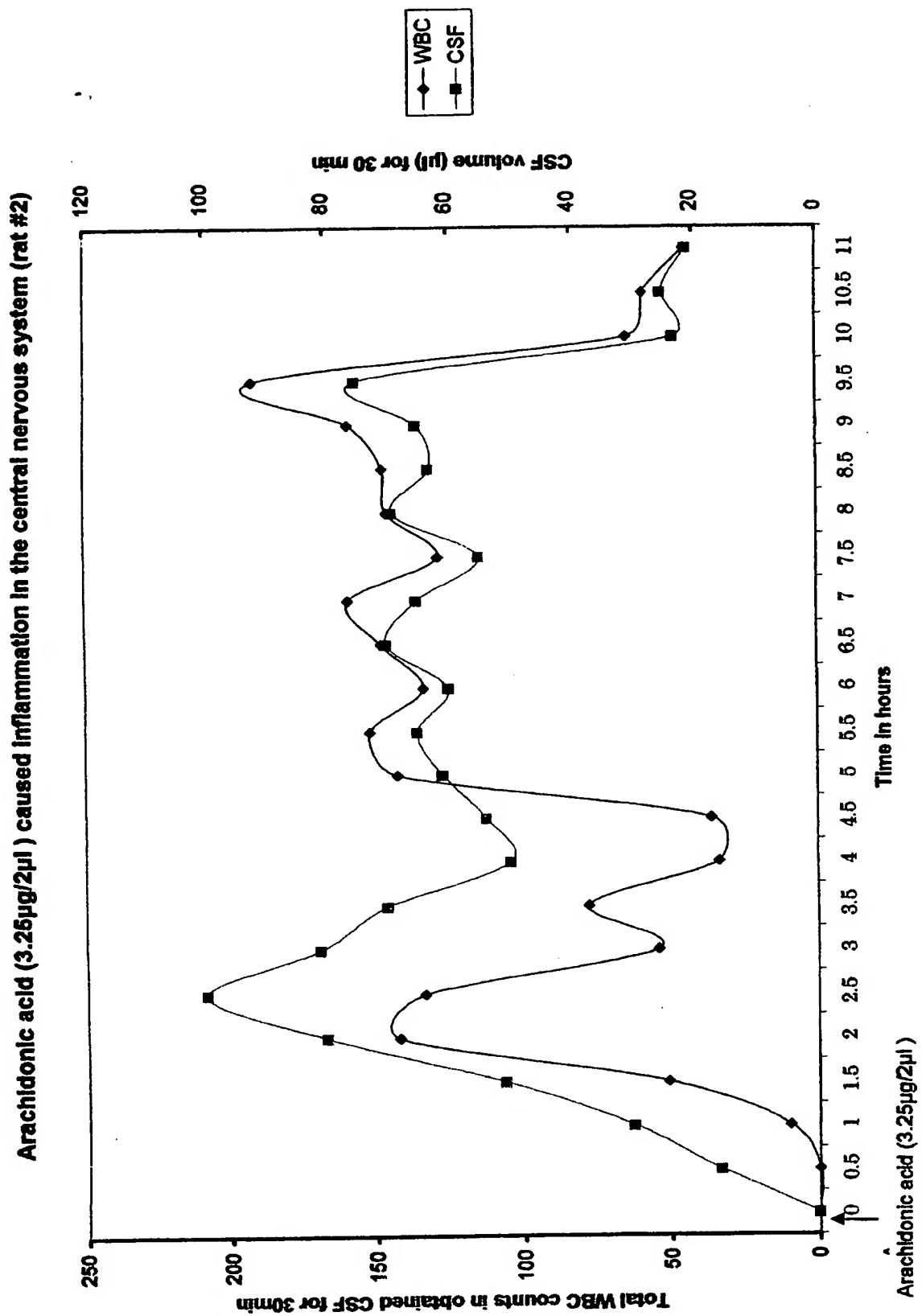
【図 2】



【図 3 A】

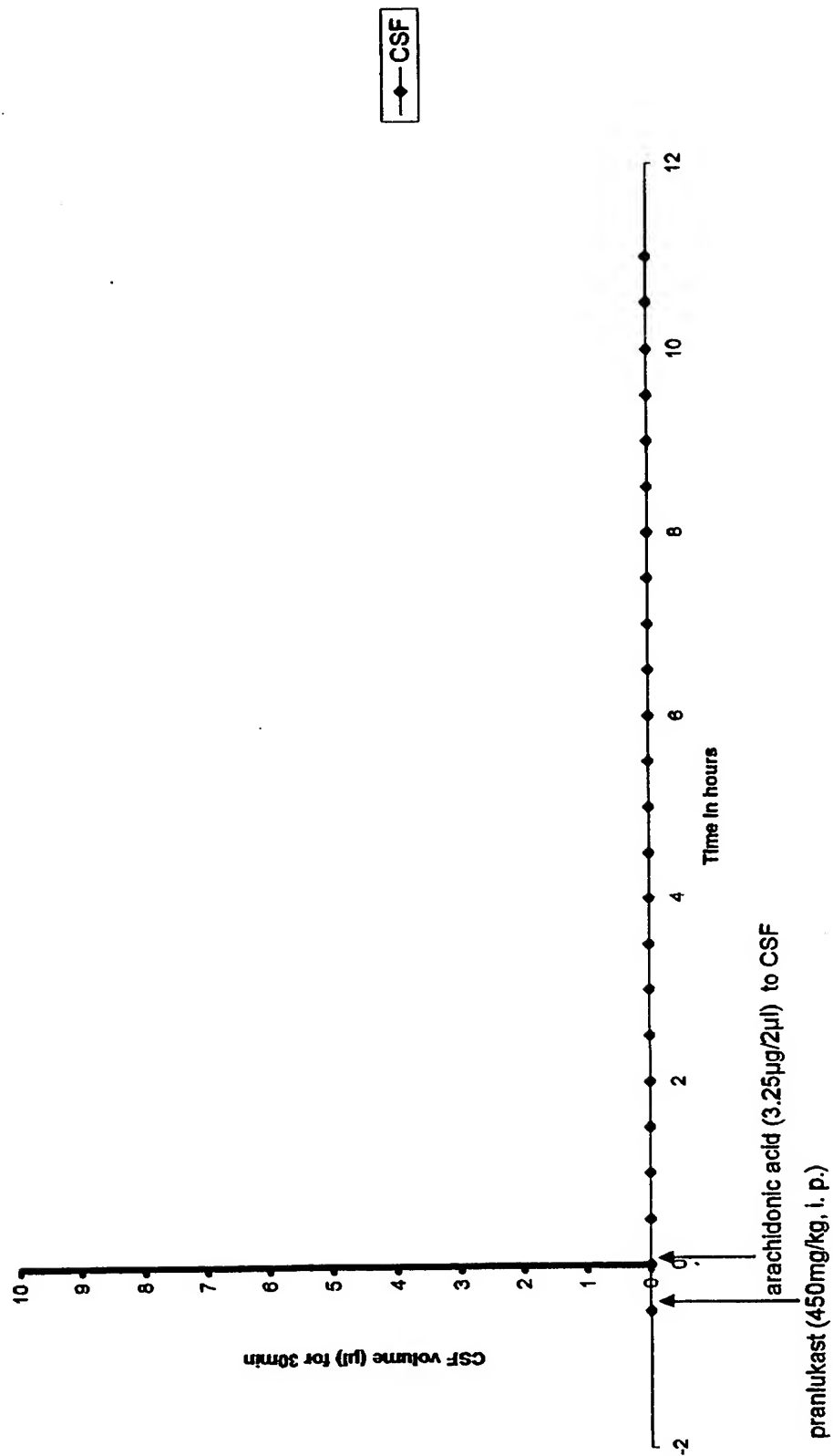


【図 3 B】



【図 4】

The Inhibitory effect of a Leukotriene C4 and D4 antagonist, pranlukast (450mg/kg, i.p.) on the Inflammation caused by arachidonic acid (3.25μg/2μl) in the central nervous system



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 血管透過性亢進抑制剤やそのスクリーニング方法、前記血管透過性亢進抑制剤を有効成分とする脳の炎症や敗血症の発生予防又は症状改善剤、前記血管透過性亢進抑制剤を投与する脳の炎症や敗血症の発生又はその症状を治療又は抑制する方法を提供すること。

【解決手段】 プランルカストが血液脳関門を通過せず若しくは殆ど通過することなく、毛細血管の管腔構造を構成する血管内皮細胞に作用し、毛細血管内の血漿成分、血球等の組織への漏出を防ぐ作用を有することを見い出した。

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-142759
受付番号	50300838686
書類名	特許願
担当官	関 浩次 7475
作成日	平成 15 年 8 月 1 日

## &lt; 認定情報・付加情報 &gt;

## 【特許出願人】

【識別番号】	503182447
【住所又は居所】	北海道札幌市南区北ノ沢 4-1-40
【氏名又は名称】	野崎 昌子

## 【代理人】

申請人	
【識別番号】	100107984
【住所又は居所】	東京都港区赤坂二丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 廣田特許事務所
【氏名又は名称】	廣田 雅紀

## 【選任した代理人】

【識別番号】	100102255
【住所又は居所】	東京都港区赤坂二丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 廣田特許事務所
【氏名又は名称】	小澤 誠次

## 【選任した代理人】

【識別番号】	100118957
【住所又は居所】	東京都港区赤坂二丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 廣田特許事務所
【氏名又は名称】	岡 晴子

## 【選任した代理人】

【識別番号】	100120086
【住所又は居所】	東京都港区赤坂 2 丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 廣田特許事務所
【氏名又は名称】	▲高▼津 一也

## 【選任した代理人】

【識別番号】	100123168
【住所又は居所】	東京都港区赤坂 2 丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 廣田特許事務所
【氏名又は名称】	大▲高▼ とし子



特願 2 0 0 3 - 1 4 2 7 5 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 0 3 1 8 2 4 4 7 ]

1. 変更年月日	2 0 0 3 年 5 月 2 0 日
[変更理由]	新規登録
住 所	北海道札幌市南区北ノ沢 4 - 1 - 4 0
氏 名	野崎 昌子